-Nucleostain- DNA Damage Quantification Kit -AP Site Counting-

5 samples, 20 samples　Technical Manual

はじめに

生物の遺伝情報を保持している DNA は、複製時の DNA polymerase のエラーに加えて、環境中の放射線や紫外線、またはアルキル化剤等の化学物質、生体内における活性酸素等の代謝産物により損傷を受ける。これらのエラーや損傷が正しく修復されなければ突然変異を誘発し、これが癌や老化の原因となる。
DNA 損傷部位には修復機構が働き、その一つとして塩基除去修復がある。この時 AP site (apurinic/apyrimidinic site) と呼ばれる塩基除去部位が出現する。つまり AP site の検出は DNA 損傷部位を測定し得る有効な方法となる。
-Nucleostain- DNA Damage Quantification Kit -AP Site Counting- は、AP site と特異的に結合する ARP (*N'*-Amino-oxymethylcarbonyl-hydrazino-D-biotin) を用いて DNA をビオチン化し、96 穴マイクロプレートに固相化して試料 DNA 中の AP site を簡便に定量できるキットである。
本キットには、精製牛胸腺 DNA から調製した AP site 数の既定された ARP Standard DNA が含まれており、これを用いて検量線を作成することにより試料 DNA の AP site 数を定量することができる。

キット内容

	5 samples	20 samples
・ARP-DNA Standard Solution		
0 ARP-DNA Standard Soln.* (0 ARP/100,000 bp)	250 μl x 1	250 μl x 1
2.5 ARP-DNA Standard Soln.* (2.5 ARP/100,000 bp)	250 μl x 1	250 μl x 1
5 ARP-DNA Standard Soln.* (5 ARP/100,000 bp)	250 μl x 1	250 μl x 1
10 ARP-DNA Standard Soln.* (10 ARP/100,000 bp)	250 μl x 1	250 μl x 1
20 ARP-DNA Standard Soln.* (20 ARP/100,000 bp)	250 μl x 1	250 μl x 1
40 ARP-DNA Standard Soln.* (40 ARP/100,000 bp)	250 μl x 1	250 μl x 1

	5 samples	20 samples
・ARP Solution (10 mmol/l ARP)	100 μl x 1	250 μl x 1
・DNA Binding Solution	10 ml x 1	10 ml x 1
・Substrate Solution	10 ml x 1	10 ml x 1
・TE Buffer	15 ml x 1	40 ml x 1
・HRP-Streptavidin	25 μl x 1	25 μl x 1
・Washing Buffer (powder for 1 L)	1 packet	1 packet
・Filtration Tube	5 tubes	20 tubes
・96-well Microplate/ U bottom	1 plate	1 plate
・Manual	1 booklet	1 booklet
* ARP-DNA Standard Solutions: 0.5 μg DNA / ml		

キット以外に必要なもの

・10 μl, 200 μl, 1 ml マイクロピペッター (可変式)
・200 μl 8 連マイクロピペッター（可変式）
・インキュベーター (37℃)
・マイクロプレートリーダー
・0.5 ml, 1.5 ml 遠心チューブ
・遠心機
・DNA 精製キット *
・ペーパータオル

＊ 本キットによる DNA の AP site 数検出は混在する RNA およびタンパクにより測定誤差を生じる可能性がある。従って RNase A 処理後、RNA と蛋白質を除去する必要がある。DNA 精製方法としてはフェノール / クロロホルム抽出による精製方法があるが、近年数多くの DNA 精製キットが市販されるようになり、さらに簡便に DNA を単離精製することが可能となった。
小社でも各種 DNA 精製キットを販売しております。(Get *pure*DNA Kit-Agarose, Get *pure*DNA Kit-Cell,Tissue)
DNA 精製に関するご質問は、小社 (フリーダイヤル：0120-489548) までお問い合わせ下さい。

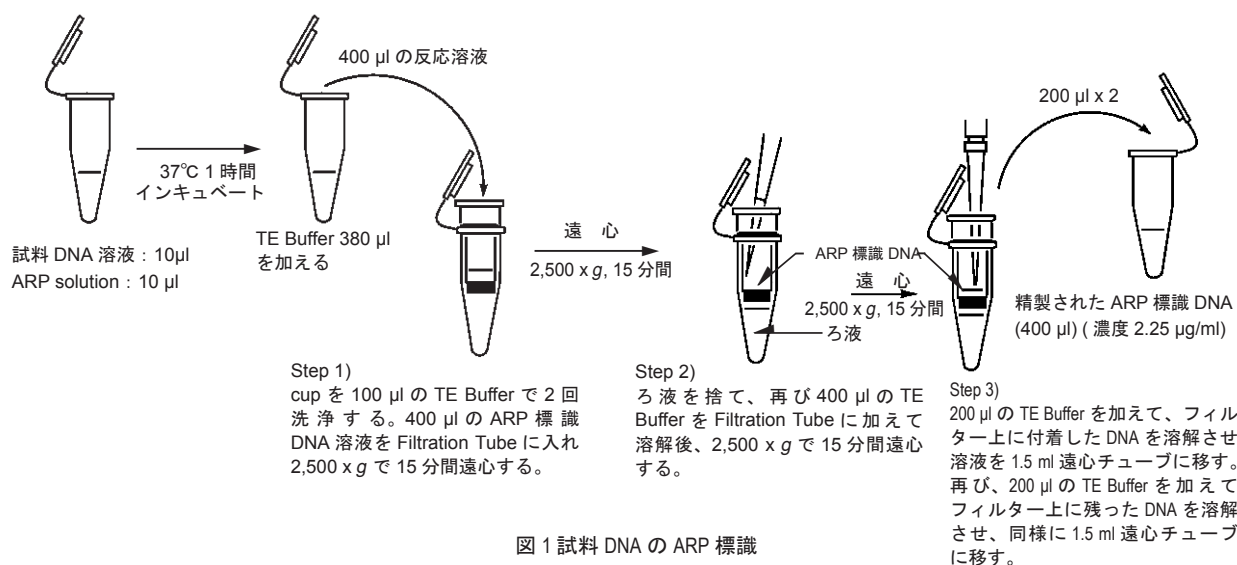



図 1 試料 DNA の ARP 標識

操作方法

1. 試料 DNA の ARP 標識 (図 1 を参照)

1) 精製した試料 DNA を TE Buffer* に溶解させ、溶液の吸光度 (260 nm) を測定する。吸光度から濃度を算出して (DNA 濃度は 50 μg/ml の時の吸光度を 1.0 として算出)100 μg/ml の濃度になるように TE Buffer* で希釈調製する。
2) 試料 DNA 溶液 10 μl と ARP Solution 10 μl を 0.5 ml 遠心チューブ中で混合する。
3) 37℃で 1 時間インキュベートする。その後、380 μl の TE Buffer を添加する。
4) まず、Filtration Tube の cup を 100 μl の TE Buffer で 2 回洗浄する。3) の溶液を Filtration Tube に入れる。
5) 遠心分離 (2,500 x *g*、15 分間) 後、ろ液を捨てる **。
6) 5) の Filtration Tube に 400 μl の TE Buffer を加え、フィルター上に付着した ARP 標識 DNA をピペッティングにより溶解させる (注意事項 − 3 参照)。
7) 再び遠心分離 (2,500 x *g*、15 分間) 後、ろ液を捨てる **。
8) 7) の Filtration Tube に 200 μl の TE Buffer を加え、フィルター上に付着した ARP 標識 DNA をピペッティングにより溶解させる (注意事項 −3 参照)。
9) 溶解させた DNA 溶液を 1.5 ml 遠心チューブに移す。
10) さらに 200 μl の TE Buffer を 8) の Filtration Tube に加え、8) の操作をもう一度繰り返し、得られた ARP 標識 DNA 溶液を 8) の DNA 溶液と合わせる ***。
11) 保存の必要がある場合、1.5 ml 遠心チューブに移した ARP 標識 DNA 溶液を 0 ～ 5℃で保存する。

* 本キットには精製した試料 DNA の溶解または、希釈に使用する TE Buffer は含まれていないので、次のように調製する。
TE Buffer(500 ml) : 滅菌水 500 ml に Tris を 606 mg(10 mmol/l)、3NA を 206 mg(1 mmol/l) 溶解し、6 mol/l の HCl で pH を 7.5 に調整後、オートクレーブ滅菌する。

** 溶液がメンブラン上に残っている場合は、更に 2,500 x *g*、5 分間遠心分離する。

*** Filtration Tube を使用した場合の DNA 回収率は 90% である。よって、溶液中の ARP 標識 DNA 濃度は 2.25 μg/ml となる。

2. AP site 数の検出

1) 操作方法 −1 で調製した ARP 標識 DNA 90 μl を 1.5 ml 遠心チューブに入れ、TE Buffer 310 μl を加える。
2) 各 ARP-DNA Standard Solution を 1 ウェル当たり 60 μl ずつ 3 ウェルに添加する (図 2 参照)。
3) 1) で調製した ARP 標識 DNA を 1 ウェル当たり 60 μl ずつ 3 ウェルに添加する。
4) DNA Binding Solution 100 μl を DNA の入ったウェルに添加し数回ピペッティングした後､室温で一夜放置する。
5) 添付の Washing Buffer 粉末をイオン交換水 1 L に溶解して洗浄用 PBST を調製する。HRP-Streptavidin を洗浄用 PBST で 4,000 倍に希釈し、希釈 HRP-Streptavidin を調製する（例 HRP-Streptavidin 10 μl ＋ PBST 40 ml)。
6) ウェル中の溶液を吸引などにより除去し、洗浄用 PBST 250 μl でプレートを洗浄する。再びウェル中の溶液を吸引などにより除去し、ペーパータオルの上でプレートを叩いてウェル中の残存溶液を完全に除く。この操作を 5 回繰り返す。
7) 希釈 HRP-Streptavidin 150 μl を各ウェルに添加し、37℃、1 時間インキュベートする。
8) 6) と同様にして、洗浄用 PBST でプレートを 5 回洗浄する。
9) Substrate Solution 100 μl を各ウェルに添加し、37℃、1 時間インキュベートする。
10) マイクロプレートリーダーにより、吸光度を測定する。630 ～ 670 nm の波長フィルターが使用可能である。
11) DNA 中の AP site 数を検量線から検出する (図 3)。

ARP-DNA Standard Solution あるいは ARP 標識 DNA(60 µl) と DNA Binding Solution(100 µl)

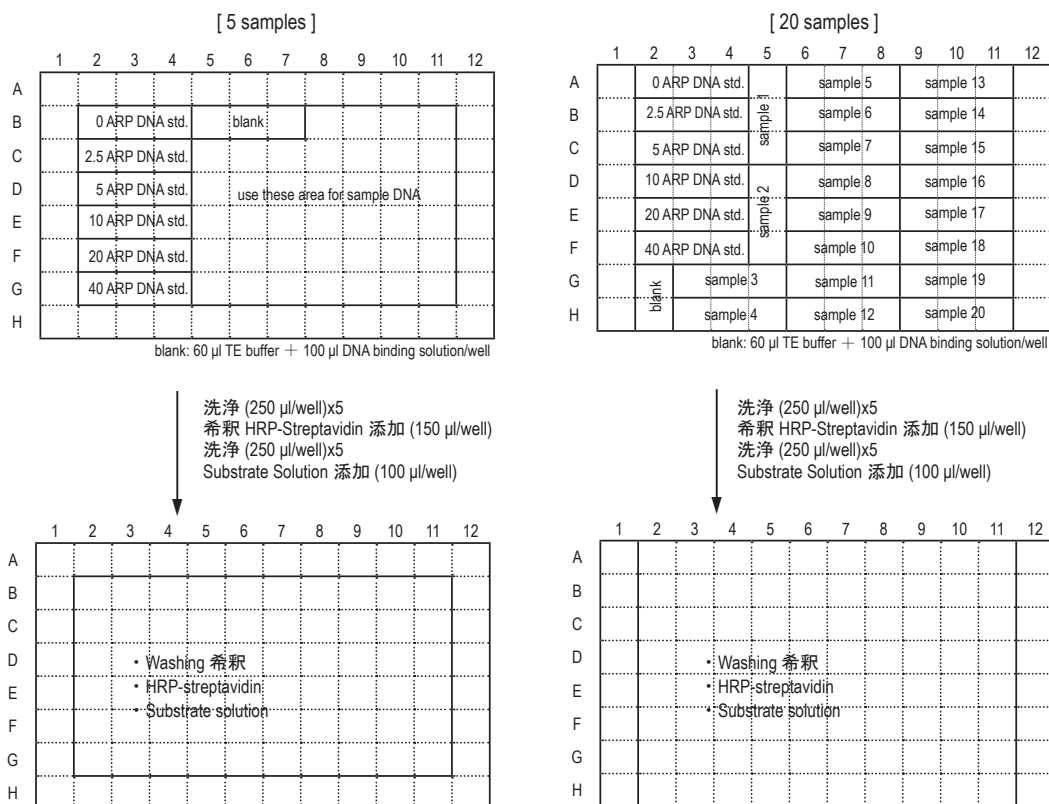



図 2　プレート配置図

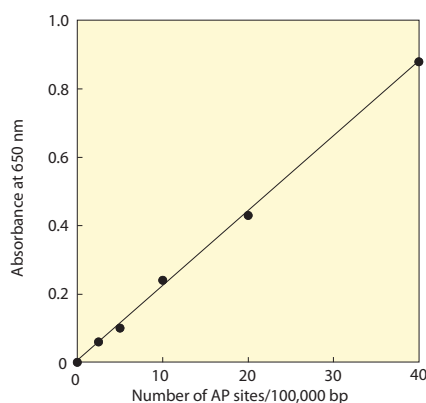



図3 ARP-DNA Standard Solutionを用いて作成した検量線例

注意事項

1. キットは 0 ～ 5℃で保存し、凍結させないで下さい。
2. 試料 DNA の AP site は一般に不安定ですので、測定対象 DNA を単離精製後は直ちに ARP 標識を行ってください。ARP 標識 DNA 溶液は 0 ～ 5℃で 1 年安定です。
3. Filtration Tube での遠心分離後は直ちに TE Buffer を添加し DNA を溶解してください。長時間 DNA をメンブラン上で放置しておきますと、DNA のメンブランへの吸着が起こり回収率にバラツキを生じる可能性があります。
4. γ線滅菌のチューブは DNA の吸着を生じる可能性がありますので、チューブを使用の際は非滅菌チューブを必要に応じてオートクレーブ滅菌して使用することを推奨します。
5. 630 ～ 670 nm のフィルターを持ち合わせていない場合は、発色反応後、各ウェルより 50 µl 抜き取り新しいプレートに移します。同量の 1 mol/l 硫酸を添加後、450 nm の吸光度で測定することができます。
硫酸添加後、速やかに測定してください。
6. ウェル洗浄後、残存する溶液により測定誤差を生じることがありますので完全に除いてください。

トラブルシューティング

A. 発色しないあるいは発色が極端に少ない

1. 試料 DNA のプレートへの固定に DNA Binding Solution を使 用しましたか。不十分な量の DNA Binding Solution を使用すると DNA がプレートにうまく固定されません。
2. 1/4,000 に希釈した HRP-Streptavidin 溶液を使用しましたか。
3. Substrate Solution を加えましたか。
4. 正しい波長で測定していますか。
5. 希釈 HRP-Streptavidin 溶液は使用直前に調製しましたか。この溶液は長時間の保存には適しません。
6. HRP-Streptavidin 溶液は適温 (0 ～ 5℃) で保存されましたか。室温あるいは冷凍状態での保存は酵素活性を著しく低下させます。

B. 試料 **DNA** が発色しない

1. 用意した試料 DNA の濃度は 100 μg/ml でしたか。
2. 試料 DNA は精製しましたか。
3. 試料 DNA 溶液に ARP Solution を加えましたか。
4. ARP 標識後、Filtration Tube を用いて精製しましたか。
5. 試料 DNA 中の AP site 数が検出限界である 1/100,000 bp より少なくありませんでしたか。

C. 全てのウェルの発色が強すぎる

1. HRP-Streptavidin 溶液は、洗浄用 PBST で 1/4,000 に希釈しましたか。高濃度の HRP-Streptavidin 溶液は高バックグラウンドの原因になります。
2. 洗浄用 PBST で各ウェルを 5 回ずつ洗浄しましたか。

D. 検量線が直線にならない／ばらつきが大きい

1. 各 ARP-DNA Standard Soln. を同量ずつ使用しましたか。
2. 洗浄用 PBST で各ウェルを 5 回ずつ洗浄しましたか。
3. 洗浄時に洗浄用 PBST を完全に除きましたか。洗浄用 PBST を除いた後、完全に水気を取るためにペーパータオルの上でプレートを逆さにして数回叩いてください。
4. 洗浄用 PBST はキット付属の Washing Buffer 粉末を純水 1 L に溶解したものを使用して下さい。高濃度あるいは低濃度の洗浄用 PBST を使用すると大きな誤差を生じることがあります。
5. DNA のプレートへの固定のため、プレートを室温で一晩放置しましたか。DNA を十分固定するためには少なくとも 4 時間のインキュベートが必要です。
6. ARP 標識後の精製は Filtration Tube を用いた方法で行いましたか。ARP のコンタミネーションは測定に重大な問題を引き起こす可能性があります。
7. 1 サンプルに 1 つの Filtration Tube を使いましたか。

E. 試料 **DNA** の測定で測定可能レンジを超える

1. 試料 DNA を 0 ARP-DNA Standard Solution で希釈して測定して下さい。測定値に希釈倍率を掛けた値が試料 DNA の AP site 数となります。試料希釈用 0 ARP-DNA Standard Solution は､別途販売しています。詳細はお問い合わせ下さい。
2. Filtration Tube で精製した後、DNA 溶液を TE Buffer で希釈しましたか。
3. 取り出した試料 DNA は十分精製されていますか。

参考文献

1. T. Lindahl and B. Nyberg, *Biochemistry*, **1972**, *11*, 3610.
2 J. Nakamura, V. E. Walker, P. B. Upton, S. Y. Chiang , Y. W. Kow and J. A. Swenberg, *Cancer Res.*, **1998**, *58*, 222.
3. K. Kubo, H. Ide, S. S. Wallace and Y. W. Kow, *Biochemistry*, **1992**, *31*, 3703.
4. H. Ide, K. Akamatsu, Y. Kimura, K. Michiue, K. Makino, A. Asaeda, Y. Takamori and K. Kubo, *Biochemistry*, **1993**, *32*, 8276.
5. A. Asaeda, H. Ide, K. Tano, Y. Takamori and K. Kubo, *Nucleosides & Nucleotides*, **1998**, *17*, 503.

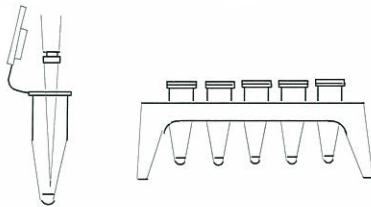
General Protocol at a Glance

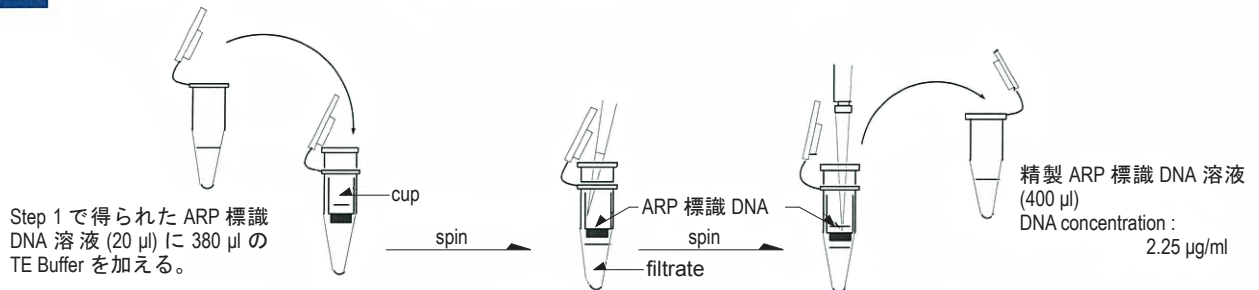
この General Protocol を使用する前に取扱説明書を良くお読みください。

Day 1

Step 1) 10 µl [a] の試料 DNA 溶液と 10 µl [a] の ARP Solution を混合し 37℃で 1 時間インキュベートする。

1 hour

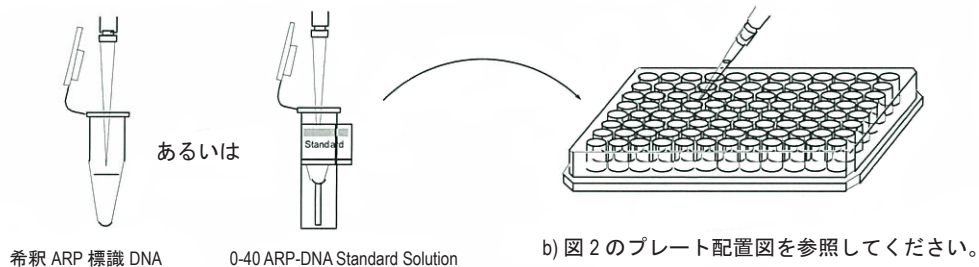
37℃

a) もし試料 DNA 溶液が 10 µl より少なかったら同量の ARP Solution を加えること。

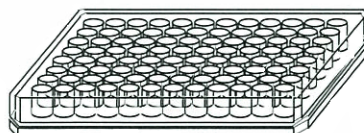
Step 2) ARP 標識 DNA を Filtration Tube で精製する。

Step i)
まず、cup を 100 µl の TE Buffer で 2 回洗浄する。400 µl の ARP ラベル化 DNA 溶液を Filtration Tube に入れ 2500 x *g* で 15 分遠心する。

Step ii)
濾液を捨て、400 µl の TE Buffer を加え ARP 標識 DNA を溶解後、再び 2500 x *g* で 15 分遠心する。

Step iii)
200 µl の TE Buffer を加えフィルター上に付着した ARP 標識 DNA を溶解する。ARP 標識 DNA 溶液を 1.5 ml チューブに移す。この操作をもう一度繰り返す。

Step 3) 90 µl の ARP 標識 DNA 溶液をチューブに取り、310 µl の TE Buffer で希釈する。60 µl の希釈溶液、あるいは ARP-DNA Standard Solution をウェルに加える [b]。

b) 図 2 のプレート配置図を参照してください。

Step 4) 100 µl の DNA Binding Solution をそれぞれのウェルに加え、数回ピペッティングしたのち室温で一晩放置する。

overnight

General Protocol at a Glance

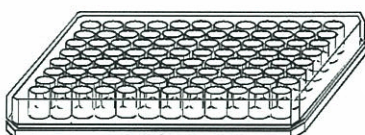
この General Protocol を使用する前に取扱説明書を良くお読みください。

Day 2

Step 5) ウェル中の溶液を除去し、洗浄用 PBST 250 µl でプレートを 5 回洗浄する。この時ウェル中の残存溶液を完全に除くため、ペーパータオルの上でプレートを逆さにしてたたくと良い。

Step 6) 希釈 HRP-Streptavidin [c] 150 µl を各ウェルに添加し 37℃で 1 時間インキュベートする。

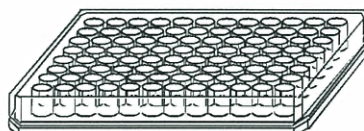
1 hour

37℃

c) 1/4000 に希釈した HRP-Streptavidin 溶液を使用すること。調製は以下のように行う。
10 µl の HRP-Streptavidin を 40 ml の洗浄用 PBST に添加し良く混合する。この溶液は用時調製すること。

Step 7) Step 5) と同様にして、洗浄用 PBST でプレートを 5 回洗浄する。

Step 8) 100　µl の Substrate Solution を各ウェルに添加し 37℃で 1 時間インキュベートする。

1 hour

37℃

Step 9) マイクロプレートリーダーで 650 nm [d] の吸光度を測定する。DNA 中の AP site 数を検量線から算出する。

d) もし 650 nm のフィルターを持ち合わせていない場合、発色後各ウェルより 50 µl づつ抜き取り新しいプレートに移し、50 µl の 1 mol/l 硫酸を添加し 450 nm の吸光度を測定することができます。

株式会社 同仁化学研究所
熊本県上益城郡益城町田原 2025-5　〒 861-2202
Tel:096-286-1515　Fax:096-286-1525　URL:www.dojindo.co.jp
ドージン・イースト（東京）Tel:03-3578-9651　Fax:03-3578-9650